

10/5/1549

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/024943 A1(51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/02, 1/66, C07K 14/72, G01N 33/15, 33/50, A61K 45/00, A61P 3/10

(74) 代理人: 森田 憲一, 外(MORITA, Kenichi et al.); 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号板橋中央ビル5階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011548

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 10 日 (10.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-265622 2002 年 9 月 11 日 (11.09.2002) JP
特願2003-56813 2003 年 3 月 4 日 (04.03.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大石 崇秀 (OHISHI, Takahide) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 小泉 智信 (KOIZUMI, Tomonobu) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING INSULIN CONTENT ENHANCER

(54) 発明の名称: インスリン含量増加剤スクリーニング方法

(57) Abstract: It is intended to disclose a tool of screening an insulin production promoter and/or an insulin content enhancer which comprises a G protein-coupled receptor showing an activity of promoting insulin production when activated or cells expressing this polypeptide. It is also intended to disclose a method of screening an insulin production promoter and/or an insulin content enhancer which comprises the step of contacting the above-described cells or cell membrane thereof with a test substance and the step of analyzing whether or not the above-described polypeptide is activated thereby. The screening tool and the screening method are useful in screening a substance which enhances the insulin content and, therefore, is usable in preventing and/or treating diabetes. It is further intended to disclose a novel insulin content enhancer which contains as the active ingredient a substance obtained by the screening as described above.

(57) 要約: 活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示す G タンパク質共役型受容体からなるか、あるいは、前記ポリペプチドを発現している細胞からなる、インスリン産生促進剤及び/又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールを開示する。また、前記細胞、又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、インスリン産生促進剤及び/又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法を開示する。前記スクリーニングツール及びスクリーニング方法は、インスリン含量を増加させ、糖尿病を予防及び/又は治療するために有用な物質のスクリーニングに有用である。更には、前記スクリーニングで得られる物質を有効成分とする、新規なインスリン含量増加剤を開示する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/024943 A1

明 細 書

インスリン含量増加剤スクリーニング方法

技術分野

本発明は、インスリン産生促進に基づくインスリン含量増加剤のスクリーニングツール及びスクリーニング方法、並びに新規なインスリン含量増加剤に関する。

背景技術

「糖尿病」は、インスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群であると定義され（非特許文献１）、その成因によって、膵β細胞の破壊性病変によるインスリン欠乏を特徴とする「インスリン依存型（１型）」と、インスリン感受性の低下とインスリン分泌低下の両者を伴う「インスリン非依存型（２型）」に分類される。

特に糖尿病患者の約９割を占める２型糖尿病においては、慢性的な高血糖により、膵β細胞の機能低下、すなわち、インスリン分泌能の低下及びインスリン含量の低下を引き起こすと理解されている（非特許文献２）。今日の臨床においては、インスリン分泌低下が認められる糖尿病患者に対する治療薬の１つとして、スルホニルウレア（ＳＵ）剤が用いられている。この薬剤は、インスリンの生合成を促進することなく、すなわち、インスリン含量を増加させることなく、膵臓からのインスリン分泌を促進させることがわかっている。更に、この薬剤は、膵β細胞の機能障害、特にインスリン欠乏を引き起こしてしまうことが知られている（非特許文献３）。従って、慢性的高血糖又はスルホニルウレア剤の使用などにより低下した膵機能を改善させる薬剤、特にインスリン産生を促進し、インスリン含量を増加させ、糖尿病を予防及び／又は治療する薬剤の開発が望まれている。

膵β細胞のインスリン含量を増加させるためには、インスリン遺伝子の転写及び／又は翻訳の過程を増強させて、インスリン生合成を促進させることが必要と考えられる。インスリンの生合成を促進させるものとして、グルコースやcAM

Pが知られており、その作用メカニズムとして、転写の亢進及びmRNAの安定化によるインスリンmRNA量の増加が知られている（非特許文献4～6）。従って、インスリンmRNAを増加させる物質（例えば、インスリンプロモーター活性を増強させる物質）は、インスリン含量を増加させる作用を有すると考えられている。

インスリン分泌の制御に関与する分子として、つまり、インスリン分泌促進作用を有する分子として報告されているGタンパク質共役型受容体が存在する〔国際公開W002/44362号パンフレット（特許文献1）〕。しかし、「インスリン産生促進作用」及び「インスリン含量増加作用」についてはこれまで全く知られていない。また、インスリン含量を増加させる物質をスクリーニングするための適したアッセイ方法についても報告はない。

国際公開W000/50562号パンフレット（特許文献2）には、国際公開W002/44362号パンフレットに開示されているヒト及びラット受容体と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、及びそれがコードするポリペプチドが記載されており、アゴニスト及びアンタゴニストの用途として、同一の多数の疾患（糖尿病を含む）を列挙している。

欧州特許出願公開第1092727A号明細書（特許文献3）及び特開2001-186888号公報（特許文献4）には、前記ヒト受容体と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列、及び国際公開W002/44362号パンフレット記載の配列に比べ1アミノ酸欠失したアミノ酸配列が記載されており、前記ポリペプチドを調節する物質の用途として、多数の疾患の治療を列挙し、糖尿病治療が好ましいと記載されている。

国際公開W001/32864号パンフレット（特許文献5）、国際公開W001/36473号パンフレット（特許文献6）、国際公開W001/42288号パンフレット（特許文献7）、国際公開W001/87929号パンフレット（特許文献8）、国際公開W002/64789号パンフレット（特許文献9）、及び国際公開W002/61087号パンフレット（特許文献10）には、前記ヒト受容体と同一のアミノ酸配列が記載されており、前記ポリペプチドを調節する物質の用途として、多数の疾患（糖尿病を含む）の治療を列挙している。また、国際公開W000/22131号パンフレット（特許文献11）、国際公

開W000/31258号パンフレット（特許文献12）、及び国際公開W002/16548号パンフレット（特許文献13）には、前記ヒト受容体と同一のアミノ酸配列が記載されており、前記ポリペプチドを調節する物質の用途として、多数の疾患の治療を列挙している。

しかし、いずれにも、これらの受容体を活性化することによりインスリン産生を促進すること、及びこれらの受容体がインスリン産生促進剤又はインスリン含量増加剤のスクリーニングツールになることの開示も示唆もなく、これらの受容体を用いたインスリン産生促進剤又はインスリン含量増加剤のスクリーニング方法についても開示も示唆もない。

（非特許文献1） 「糖尿病」，1999年，第42巻，第5号，p. 385-404

（非特許文献2） シー・ロナルド・カーン及びゴードン・シー・ウィアー
（C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir）編，金澤康徳，他3名訳，「ジョスリン糖尿病学」，医学書院エムワイダブリュー，1995年，p. 245-268

（非特許文献3） シー・ロナルド・カーン及びゴードン・シー・ウィアー
（C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir）編，金澤康徳，他3名訳，「ジョスリン糖尿病学」，医学書院エムワイダブリュー，1995年，p. 505-525

（非特許文献4） 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー
（The Journal of Biological Chemistry）」，（米国），1985年，第260巻，
p. 13585-13589

（非特許文献5） 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー
（The Journal of Biological Chemistry）」，（米国），1985年，第260巻，
p. 13590-13594

（非特許文献6） 「ダイアピーティーズ（Diabetes）」，（米国），1977年，
第26巻，p. 538-545

（特許文献1） 国際公開W002/44362号パンフレット

（特許文献2） 国際公開W000/50562号パンフレット

（特許文献3） 欧州特許出願公開第1092727A号明細書

（特許文献4） 特開2001-186888号公報

（特許文献5） 国際公開W001/32864号パンフレット

- (特許文献 6) 国際公開W001/36473号パンフレット
- (特許文献 7) 国際公開W001/42288号パンフレット
- (特許文献 8) 国際公開W001/87929号パンフレット
- (特許文献 9) 国際公開W002/64789号パンフレット
- (特許文献 10) 国際公開W002/61087号パンフレット
- (特許文献 11) 国際公開W000/22131号パンフレット
- (特許文献 12) 国際公開W000/31258号パンフレット
- (特許文献 13) 国際公開W002/16548号パンフレット

発明の開示

本発明の課題は、インスリン産生を促進することにより、インスリン含量を増加させ、糖尿病を予防及び／又は治療するために有用な物質のスクリーニングに役立つツール、スクリーニング法及び新規なインスリン産生促進剤及び／又は含量増加剤を提供することにある。

インスリン産生を促進するか否かは、インスリンプロモーター遺伝子の活性化を指標に判断することができる。インスリンプロモーター遺伝子を活性化する物質の中には、例えば、細胞内でインスリンプロモーターに直接結合して活性化する因子を介するものや、細胞膜表面上にあるタンパク質〔例えば、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）〕に直接作用して、その活性を制御することにより、インスリンプロモーター活性を増強させる物質が含まれる。インスリンプロモーター活性を上げるような薬剤のうち、細胞内で作用する物質は、細胞膜（更には核膜）を通過する必要があるが、細胞膜表面のタンパク質が標的である場合は、細胞膜の通過は必要ない。現在知られている薬の約半数以上が、細胞膜表面にあるタンパク質を標的としていることから、この種のタンパク質は医薬品の標的として魅力的であり、創薬上可能性の高い標的となり得ると考える。従って、細胞膜に存在するタンパク質で、インスリンプロモーター遺伝子の活性を制御することのできる分子（創薬標的分子）の発見は、インスリン含量を増加させるという糖尿病治療薬開発にとって非常に重要であり、糖尿病の予防と治療に貢献するものと考えられる。

本発明者は、鋭意研究の結果、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるGPCRが活性化されることにより、インスリンプロモーター活性を上昇させ、インスリン産生促進が増加することを見出し、これに基づき、前記GPCRを用いたインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤のスクリーニング法を提供した。また、本発明のスクリーニング法で得られた、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるGPCRを活性化する物質が、確かにインスリンプロモーター活性を上昇させることを確認し、新たなインスリン産生促進剤を提供し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

[1] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～15個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール；

[2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール；

[3] 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール；

[4] 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール（以下、[1]～[4]に記載のインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールを、総称して、ポリペプチド型スクリーニングツールと称する）；

[5] [1]～[4]に記載のポリペプチドを発現している細胞からなる、イン

スリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール（以下、細胞型スクリーニングツールと称する）；

〔6〕請求項１～４に記載のポリペプチド又は請求項５に記載の細胞の、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングのための使用；

〔7〕〔5〕に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び〔1〕～〔4〕に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法；

〔8〕〔5〕に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び請求項１～４に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、並びに、製剤化工程を含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤医薬組成物の製造方法；

〔9〕〔1〕～〔4〕に記載のポリペプチドを活性化する物質を有効成分として含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤；

〔10〕〔1〕～〔4〕に記載のポリペプチドを活性化する物質を投与することからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加方法；並びに

〔11〕インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤医薬組成物製造のための、〔1〕～〔4〕に記載のポリペプチドを活性化する物質の使用に関する。

本明細書において、「スクリーニングツール」とは、スクリーニングに用いるための物（具体的には、スクリーニングに用いるためのポリペプチド又はポリペプチドを発現している細胞）を意味する。「インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール」とは、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤をスクリーニングするために、試験物質を接触させる対象として用いるためのポリペプチド又は細胞である。「インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤」とは、インスリン産生促進剤、インスリン含量増加剤、及び、インスリン産生促進に基づくインスリン含量増加剤を意味する。

図面の簡単な説明

図1は、プラスミド *InsPro* と一緒に、プラスミド *pEF-BOS SSF-NA* 又はコントロールベクター（プラスミド *pEF-BOS*）を遺伝子導入されたマウス膵β細胞株 *NI T 1* 細胞における、ルシフェラーゼ活性を示すグラフである。縦軸は、ルシフェラーゼ活性を表わす。

図2は、プラスミド *InsPro* を遺伝子導入したマウス膵β細胞株 *NI T 1* 細胞を、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート（以下、化合物Aと称する）処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。縦軸はルシフェラーゼ活性、横軸は化合物濃度（ $\mu\text{mol/L}$ ）を表わす。

図3は、プラスミド *InsPro* を遺伝子導入したマウス膵β細胞株 *NI T 1* 細胞を、4-〔5-〔（E）-（1,3-ジエチル-5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イリデン）メチル〕-2-フリル〕安息香酸（以下、化合物Bと称する）、（2Z）-2,3-ビス（3,4-ジメトキシフェニル）アクリロニトリル（以下、化合物Cと称する）、4-〔（E）-2-（3,4-ジメトキシフェニル）ビニル〕ピリジン（以下、化合物Dと称する）、又は5-〔〔4-（3-メチル-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル）ベンジル〕チオ〕-1H-1,2,4-トリアゾール-3-アミン（以下、化合物Eと称する）で処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。縦軸はルシフェラーゼ活性、記号「R」はコントロールを表わす。

図4は、化合物Aを腹腔内投与した、または、化合物A無添加SDラットにおける、グルコース経口負荷後の血漿中インスリン濃度の経時変化を示すグラフである。縦軸は血漿中インスリン（ ng/mL ）、横軸はグルコース経口負荷後の時間（分）を表す。

図5は、化合物Aを腹腔内投与した、または、化合物A無添加SDラットにおける、グルコース経口負荷後の血糖値の経時変化を示すグラフである。縦軸は血糖値（ mg/dL ）、横軸はグルコース経口負荷後の時間（分）を表す。

図6は、化合物Aを経口投与した、または、化合物A無添加GKラットにおける、グルコース経口負荷後の血糖値の経時変化を示すグラフである。縦軸は血糖値（ mg/dL ）、横軸はグルコース経口負荷後の時間（分）を表す。

発明を実施するための最良の形態

1. 本発明のスクリーニングツール

本発明のインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールには、ポリペプチド型スクリーニングツールと、細胞型スクリーニングツールとが含まれる。

(1) ポリペプチド型スクリーニングツール

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできるポリペプチドとしては、例えば、

(i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～15個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）；及び

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）

を挙げることができる。以下、本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできるこれらの各種ポリペプチドを、総称して、スクリーニングツール用ポリペプチドと称する。

スクリーニングツール用ポリペプチドの1つである、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、335個のアミノ酸残基からなるヒト由来のGタンパク質共役型受容体である。また、スクリーニングツール用ポリペプチドの1つである、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、335個のアミノ酸残基からなるラット由来のGタンパク質共役型受容体である。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒト由来のポリペプチドと、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるラット由来のポリペプチドとは、アミノ酸

配列の比較において80.6%の相同性を示す。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により得られた値を意味し、アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、BLASTパッケージ (sgi32bit版, バージョン2.0.12; NCBIより入手) のblastpプログラム (Tatiana A. Tatusova及びThomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用い、デフォルトパラメーターに従って算出することができる。ペアワイズ・アラインメント・パラメーターとして、プログラム名「blastp」を使用し、Gap挿入Cost値を「0」で、Gap伸長Cost値を「0」で、Query配列のフィルターとして「SEG」を、Matrixとして「BLOSUM62」をそれぞれ使用して得られる「同一性」を意味する。

配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるこれらのポリペプチドは、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性（以下、インスリン産生促進活性と称することがある）を示す。

本明細書において、或るポリペプチドが「活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、例えば、以下の方法（好ましくは、後述の実施例3に記載の方法）により確認することができる。すなわち、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、前記ポリヌクレオチドを含まないコントロール用発現ベクターとで、それぞれ、細胞を形質転換する。この際、前記の各発現ベクターに加え、インスリンプロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したプラスミドと一緒に、細胞を形質転換する。形質転換後、所定時間（例えば、24時間）培養した後、培地を除去し、細胞溶解液で細胞を溶解し、溶解液中のレポーター活性をそれぞれ測定する。コントロール用発現ベクターで形質転換した細胞（コントロール細胞）における溶解液中のレポーター活性に比べて、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換した細胞（試験細胞）における溶解液中のレポーター活性が上昇していれば、前記ポリペプチドが「活性化されることにより、インスリン産生を促進

する活性」を示すと判定することができる。

本明細書において、Gタンパク質共役型受容体であるスクリーニングツール用ポリペプチドが「活性化」された状態とは、リガンドとの結合の有無に関わらず、Gタンパク質共役型受容体の下流にシグナルが伝達されている状態を意味する。活性型Gタンパク質共役型受容体の絶対量が一定量を越えた場合に、これらのポリペプチドは活性化される。

Gタンパク質共役型受容体は、不活性型と活性型との間の平衡状態にあり、リガンドがGタンパク質共役型受容体に結合することにより、平衡が活性型にシフトする。Gタンパク質共役型受容体を過剰に発現させた場合にも、活性型Gタンパク質共役型受容体の絶対量が増えるため、リガンド非存在下であっても、活性化され、下流にシグナルが伝達されることが知られている (Milano, C. A. ら, Science, 264, 582-586, 1994)。すなわち、Gタンパク質共役型受容体は、リガンドが特定されていない場合であっても、Gタンパク質共役型受容体を細胞に過剰発現させることにより、その受容体からのシグナルを検出することが可能な場合がある。後述の実施例3に記載の実験では、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するリガンド非存在下であっても、これらのポリペプチドを過剰発現させることにより、アゴニストの結合による活性化と同じ状態に活性化されている。

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできる機能的等価改変体は、天然に存在する配列であるか、人工的に製造した配列であるかを問わず、その起源も特に限定されるものではない。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体、あるいは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのラットにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト及びラット以外の生物（例えば、マウス、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体も本発明に含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト又はラット由来の変異体、あるいは、ヒト及びラット以外の生物由来の機能的等価改変体）、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのアミノ酸配列を、遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなども、前記機能的

等価改変体に該当する限り、本発明に含まれる。なお、本明細書において「変異体」(variation)とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

機能的等価改変体としては、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、全体として1~15個、好ましくは1~10個、より好ましくは1~7個、特に好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、インスリン産生促進活性を示すポリペプチドがより好ましい。

配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、インスリン産生促進活性を示すポリペプチドとして、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等を付加したポリペプチド(すなわち、融合ポリペプチド)も、インスリン産生促進活性を示す限り、含まれる。

前記マーカー配列としては、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできる相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、インスリン産生促進活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができる。

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできるスクリーニングツール用ポリペプチドは、種々の公知の方法によって得ることができ、

例えば、国際公開W002/44362号パンフレットに記載の方法に従って製造することができる。

(2) 細胞型スクリーニングツール

本発明の細胞型スクリーニングツールとして用いることのできる細胞（以下、スクリーニングツール用細胞と称する）は、細胞型スクリーニングツールとして用いる際に前記ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではなく、前記発現ベクターで形質転換された細胞であることもできるし、あるいは、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株（例えば、膵臓 β 細胞株、好ましくはNIT1細胞）であることもできる。

本発明の細胞型スクリーニングツールとして用いることのできるスクリーニングツール用細胞としては、形質転換細胞がより好ましく、例えば、

- (i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現している形質転換細胞；
 - (ii) 機能的等価改変体を発現している形質転換細胞；及び
 - (iii) 相同タンパク質を発現している形質転換細胞
- を挙げることができる。

スクリーニングツール用細胞は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、宿主細胞（好ましくは真核生物、特に好ましくは293-EBNA細胞）を形質転換させることにより取得することができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリペプチドを発現させることが可能である。

発現ベクターで形質転換された細胞としては、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。スクリーニングツール用細胞は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにより、所望

の宿主細胞を形質転換することにより得ることができ、より具体的には、例えば、国際公開W002/44362号パンフレットに記載の方法に従って製造することができる。

2. インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法

スクリーニングツール用ポリペプチド又はスクリーニングツール用細胞を用いると、スクリーニングツール用ポリペプチドの活性を制御可能な物質、特に、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングすることができる。先に述べたように、スクリーニングツール用ポリペプチドは、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を有する。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質は、インスリン産生を促進することのできるインスリン含量増加剤の有効成分として有用である。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドそれ自体、あるいは、スクリーニングツール用細胞それ自体を、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤のスクリーニングツールとして使用することができる。

本明細書において、「インスリン産生促進」とは、コントロール群に対して有意にインスリン産生促進活性が増加しており、かつ、コントロール群に対する試験物質処理群のインスリン産生促進活性が、1.5倍以上（好ましくは5倍以上）である場合を意味する。

本発明のスクリーニングツールを用いてスクリーニングにかけることのできる試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験物質として用いることができる。更には、本発明のインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールにより選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いる

ことができる。

本発明のスクリーニング方法は、受容体として機能するようにスクリーニングツール用ポリペプチドを発現しているスクリーニングツール用細胞又はその細胞膜と試験物質とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む限り、特に限定されるものではないが、前記ポリペプチドの活性化を分析するのに用いる方法の違いに基づいて、例えば、

- 1) 細胞内 cAMP 濃度の変動を指標とするスクリーニング方法（以下、cAMP 型スクリーニング方法と称する）、
- 2) GTP γ S 結合法を利用するスクリーニング方法（以下、GTP γ S 結合型スクリーニング方法と称する）、
- 3) リガンド結合アッセイ法を利用するスクリーニング方法（以下、リガンド結合型スクリーニング方法と称する）、及び
- 4) インスリンプロモーター活性を指標とした方法（以下、インスリンプロモーター活性型スクリーニング方法と称する）

を挙げることができる。

本発明のスクリーニング方法は、cAMP 型スクリーニング方法（特には実施例 4 に記載の方法）又はインスリンプロモーター活性型スクリーニング方法（特には実施例 5 に記載の方法）を用いることが好ましく、cAMP 型スクリーニング方法（特には実施例 4 に記載の方法）及びインスリンプロモーター活性型スクリーニング方法（特には実施例 5 に記載の方法）を組み合わせる用いることがより好ましい。

また、形質転換細胞でなく、天然の細胞又はその細胞株を用いてスクリーニングを行なった場合には、前記 (i) ~ (iii) の形質転換細胞をスクリーニングツールとして用い、前記スクリーニングで得られた物質がスクリーニングツール用ポリペプチドを活性化することを確認することが望ましい。

1) cAMP 型スクリーニング方法

細胞内 cAMP 濃度の変動を指標として、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングする場合には、

スクリーニングツール用細胞と、試験物質とを接触させ、前記細胞内の cAMP 濃度の変化を直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）することにより、前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する。すなわち、細胞内 cAMP 濃度の変動を指標とする本発明の cAMP 型スクリーニング方法では、スクリーニングツール用細胞と試験物質とを接触させる工程、及び前記細胞内における cAMP 濃度の変化を分析する工程を含む。より具体的には、後述の実施例 4 に記載の方法により実施することが好ましい。例えば、試験物質を一定時間作用させ、細胞内 cAMP 濃度の上昇を指標に、コントロール細胞に対して、スクリーニングツール用細胞において 1.5 倍以上（好ましくは 5 倍以上）の活性上昇を示す試験物質をアゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

cAMP 濃度の変化は、例えば、市販の cAMP 測定キット（Amersham 社等）を用いて、直接的に cAMP 濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、後述の実施例 4 に示すように、cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子の upstream に cAMP 応答配列（CRE）を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的に cAMP 濃度の変化を分析することもできる。

スクリーニングツール用細胞と試験物質とを接触させた場合に、前記細胞内の cAMP 濃度が上昇すれば、前記試験物質は、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するアゴニストであると判定することができる。なお、コントロール細胞として、スクリーニングツール用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されていない宿主細胞、あるいは、空ベクターで形質転換した形質転換細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験物質によりこれらのコントロール細胞内の cAMP 濃度が上昇しないことを確認することが好ましい。

市販の cAMP 測定キット（Amersham 社等）を用いて、直接的に cAMP 濃度の変化を分析することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質をスクリーニングする場合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする遺伝子を導入した細胞を、遺伝子導入した後、20 時間培養し、続いて、培地を吸引した後、1 mmol/L IBMX (3-isobutyl-1-methylx

anthine) / DMEM 400 μ L を加え、5% CO₂ 存在下、37°C で 10 分間インキュベートする。更に、1 mmol / L - IBMX / DMEM 100 μ L で希釈した試験物質（例えば、化合物、ペプチド、又は抗体等）を添加し、更に 30 分間インキュベートする。培地を吸引し、得られた細胞における cAMP 量を、市販の cAMP 測定キット [例えば、cAMP 酵素免疫アッセイ系 (cAMP enzyme immunoassay system; Amersham pharmacia biotech 社)] を用いて測定する。試験物質存在下における特異的な cAMP 量の上昇が観察された試験物質を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤としてスクリーニングすることができる。

cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を分析し、間接的に cAMP 濃度の変化を分析することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質をスクリーニングする場合には、例えば、後述の実施例 4 に示すように、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする遺伝子と、cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子 [例えば、ルシフェラーゼの遺伝子の upstream に cAMP 応答配列 (CRE) を挿入した遺伝子；例えば、pCRE-Luc ベクター

(CLONTECH 社)] とを導入した細胞を、遺伝子導入した後、18~20 時間培養し、培地で希釈した試験物質を加え、5% CO₂ 存在下、37°C で 5~6 時間インキュベートする。培地を吸引し、細胞溶解液で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を測定する。試験物質存在下における特異的なレポーター活性の上昇が観察された物質等を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤としてスクリーニングすることができる。

2) GTP γ S 結合型スクリーニング方法

GTP γ S 結合法 (Lazareno, S. 及び Birdsall, N. J. M., Br. J. Pharmacol., 109, 1120-1127, 1993) を利用して、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質 (すなわち、アゴニスト) をスクリーニングする場

合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現させた細胞膜を、 20mmol/L HEPES (pH 7.4)、 100mmol/L NaCl、 10mmol/L MgCl₂、及び 50mmol/L GDP混合溶液中で、³⁵Sで標識されたGTPγS (400pmol/L) と混合する。試験物質存在下と試験物質不在下とでインキュベートした後、反応液をガラスフィルター等で濾過し、フィルターに残存するGTPγSの放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。試験物質存在下における特異的なGTPγS結合の上昇を指標に、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するアゴニスト、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤をスクリーニングすることができる。

GTPγS結合法を利用する本発明のGTPγS結合型スクリーニング方法では、³⁵Sで標識されたGTPγS存在下において、スクリーニングツール用細胞の細胞膜と試験物質とを接触させる工程、及び前記細胞膜と結合したGTPγSと、未結合のGTPγSとを分離し、分離されたいずれか一方に含まれる放射活性を分析する工程を含む。

3) リガンド結合型スクリーニング方法

リガンド結合アッセイ法を利用して、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドに結合する物質をスクリーニングする場合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現させたスクリーニングツール用細胞、若しくはその細胞膜、又はスクリーニングツール用ポリペプチド（好ましくはその精製標品）を調製する。緩衝液、イオン、及び／又はpHのようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で、前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞若しくはその細胞膜、又は前記ポリペプチドと、例えば、前記cAMP型スクリーニング方法及び／又はGTPγS結合型スクリーニング方法で取得することができる物質（すなわち、アゴニスト）の標識体とを、試験物質と共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し、適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。得られた標識体の

結合阻害を指標に、スクリーニングツール用ポリペプチドのリガンドを選択することができる。なお、このリガンドが、アゴニスト又はアンタゴニストであるかについては、前記cAMP型スクリーニング方法及び／又はGTPγS結合型スクリーニング方法などにより確認することができる。

4) インスリンプロモーター活性型スクリーニング方法

インスリンプロモーター活性を指標として、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングする場合には、スクリーニングツール用細胞と、試験物質とを接触させ、前記細胞内のインスリンプロモーター活性の変化を分析（すなわち、測定又は検出）することにより、前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する。

インスリンプロモーター活性の変化は、例えば、後述の実施例5に示すように、インスリンプロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したプラスミドを用いて、その転写活性を分析することにより、インスリンプロモーター活性の変化を分析することができる。

より具体的には、例えば、インスリンプロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したプラスミドを、スクリーニングツール用細胞に導入した後、18～20時間培養し、培地で希釈した試験物質を加え、5%CO₂存在下、37℃で24時間インキュベートする。培地を吸引し、細胞溶解液で溶解した後、そのレポーター活性（例えば、ルシフェラーゼ活性）を測定する。試験物質存在下における特異的なレポーター活性の上昇が観察された物質等を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤としてスクリーニングすることができる。なお、コントロール細胞として、スクリーニングツール用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現していない細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験物質によりこれらのコントロール細胞では、インスリンプロモーターレポーター活性が上昇しないことを確認することが好ましい。

3. インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物

本発明には、例えば、本発明のスクリーニング方法で選択することのできる、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質〔例えば、DNA、タンパク質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物〕を有効成分とするインスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物が包含される。有効成分として、例えば、実施例6に記載した、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート、4-〔5-〔（E）-（1, 3-ジエチル-5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イリデン）メチル〕-2-フリル〕安息香酸、（2Z）-2, 3-ビス（3, 4-ジメトキシフェニル）アクリロニトリル、4-〔（E）-2-（3, 4-ジメトキシフェニル）ビニル〕ピリジン、及び5-〔〔4-（3-メチル-1, 2, 4-オキサジアゾール-5-イル）ベンジル〕チオ〕-1H-1, 2, 4-トリアゾール-3-アミンなどが挙げられる。

また、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の品質規格の確認試験において、（1）スクリーニングツール用細胞、又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及びスクリーニングツール用ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、あるいは、（2）スクリーニングツール用細胞、又はその細胞膜と、試験物質とを、スクリーニングツール用ポリペプチドの標識アゴニスト存在下で、接触させる工程、及び前記細胞又はその細胞膜への標識アゴニストの結合量の変化を分析する工程からなる分析を行ない、次いで、分析した物質を製剤化することからなる、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

また、前記工程による分析を含む本発明のスクリーニング方法で得られた物質を製剤化することからなる、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

本発明の医薬組成物における有効成分としては、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を用いることができ、前記活性化物質は、例えば、本発明のスクリーニング方法により選択することができる。本発明の医薬組成物は、本発明のスクリーニング方法で得られた物質を有効成分とする医薬組成物に限定

されず、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を有効成分とするインスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物であれば全て包含される。

なお、インスリン産生及びインスリン含量の増加の確認は、当業者に公知の方法、あるいは、それを改良した方法を用いることにより実施することができる。例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を糖尿病モデル動物に連続投与し、膵臓中のインスリンmRNA又はインスリタンパク質の量を測定することにより確認することができ、更には、前述の条件のもと、常法に従って随時血糖低下作用を確認することにより、あるいは、経口糖負荷試験後の血糖上昇抑制作用の確認を行なうことにより、糖尿病治療効果の有無を判定することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質〔例えば、DNA、タンパク質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物〕を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる薬理学上許容される担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて、医薬組成物として調製することができる。本発明には、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を、インスリン産生促進及び／又はインスリン含量増加の必要な対象に、有効量で投与する工程を含む、インスリン産生促進及び／又はインスリン含量の増加方法が含まれる。また、本発明には、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質の、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物を製造するための使用が含まれる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあつては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、又はポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組

成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～100mg、好ましくは0.1～50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～50mg、好ましくは0.01～10mgである。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を

限定するものではない。なお、特に断らない限り、公知の方法（“Molecular Cloning-A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982 等）に従って実施した。

実施例 1：配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む発現ベクターの製造

国際公開W002/44362号パンフレットの実施例 1 に記載の手順に従って、配列番号 1 で表される塩基配列を有する DNA を取得し、pEF-BOS プラスミドに導入した（以下、プラスミド pEF-BOS-NA と称する）。次いで、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させるために、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする全長 DNA を導入した pEF-BOS シグナルシーケンスフラッグプラスミド（以下、プラスミド pEF-BOS SSF-NA と称する）を製造した。これは、目的とするポリペプチドの N 末端にシグナルシーケンスを付加することができる発現ベクターを用いることにより、目的ポリペプチドを細胞膜に高頻度が発現させるためである。

実施例 2：ヒトインスリンプロモーターレポータープラスミドの構築

ヒトのインスリン遺伝子の 5' 発現制御領域は、塩基配列が同定されており（Nature, 284, 26-32, 1980）、転写因子結合部位として知られる複数のシス（cis）エレメントは、マウスやラットのインスリン遺伝子の 5' 発現制御領域にも共通に存在している（Diabetes, 44, 1002-1004, 1995）。これらの種を越えて共通のシスエレメントを含み、且つプロモーター活性を示すのに充分と考えられる領域（本実施例では、-342 から +37 の領域を使用した。なお、数字の +1 は、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 11572-11577, 1998 に示された想定上の転写開始点を表す）を、ヒトゲノム DNA（Cat. No. 6550-1; Clontech 社）を用いて 5' 側に HindIII サイト、3' 側に NcoI サイトができるようにしてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅し、プラスミド pCR2.1-Topo（Cat. No. K455001, TA クローニングシステム; Invitrogen 社）にクローニングした。

具体的な PCR の増幅条件は次の通りである。DNA ポリメラーゼ（Ampli

Taq DNAポリメラーゼ; Applied Biosystems社) を用いて、1サイクル当たり、94℃で30秒間、2本鎖DNAを熱変性し、55℃で30秒間、プライマーを変性した1本鎖DNAにアニーリングさせ、引き続き、72℃で1分間、DNA伸長反応させた。これを30サイクル繰り返した。PCRに用いたプライマー [Ins17(h) 及び Ins19(h)] の塩基配列を配列番号5及び6に示す。

次に、増幅断片がクローニングされたプラスミドを、制限酵素HindIII (宝酒造) 及びNcoI (宝酒造) を用いて消化することによりプラスミドから増幅断片を切り出し、ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド (Cat. No. 306-04831, ルシフェラーゼベクターpGV-B2; 東洋インキ) のルシフェラーゼ遺伝子の開始コドンのNcoIサイトとその5' 上流に位置するHindIIIサイトとの間にクローニングした。クローニングしたヒトインスリンプロモーターの塩基配列は、ジデオキシターミネーター (dideoxy terminator) 法によりDNAシーケンサー (ABI377 DNA Sequencer; Applied Biosystems社) を用いて決定した。決定した塩基配列を配列番号7に示す。

このようにして、ヒトインスリンプロモーターレポータープラスミドpIns-Luc380 (以下、プラスミドInsProと称する) を構築した。なお、このプラスミドを細胞に導入し、このプラスミドに含まれるインスリンプロモーター部分が活性化されれば、ルシフェラーゼ遺伝子が生合成される。このルシフェラーゼ活性を測定することにより、インスリンプロモーター活性を測定することができる。

実施例3：配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの過剰発現によるインスリンプロモーターレポーター活性の変化

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのセカンドメッセンジャーの1つは、cAMPであることが知られている (国際公開W002/44362号パンフレットの実施例4参照)。

本実施例では、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの過剰発現によるインスリンプロモーター活性に与える影響を検討した。

96穴プレートに、マウス膵β細胞株NIT1細胞 (4×10^4 細胞/ウエ

ル；ATCC：CRL-2055）を播種し、10%牛胎児血清（FCS）を含むF-12培地中で一晚培養した後、トランスフェクション試薬（FuGENE6；Boeringer Mannheim社）を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS SSF-NA（10ng）と実施例2で作製したプラスミドInsPro（1ng）とを遺伝子導入した。なお、コントロールとして、プラスミドpEF-BOS（コントロール用の空ベクター）とプラスミドInsProとを遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に24時間培養し、培地を吸引した後、細胞溶解液（細胞溶解液LGβ；東洋インキ）で溶解し、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット（ピッカジーン発光キット；東洋インキ）及び測定装置（ML3000 microtiter plate luminometer；Dynatech Laboratories社）を用いて測定した。

結果（平均値±標準誤差，n=4）を図1に示す。図1に示すように、プラスミドpEF-BOS SSF-NAを導入した細胞では、プラスミドpEF-BOSを導入した細胞と比較して、有意なインスリンプロモーター活性の上昇が確認された。スチューデントのt-テストによれば、 $P=0.0018$ であった。従って、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを過剰発現させることにより、すなわち、活性化させることにより、インスリンプロモーター活性が上昇することが判明した。

以上の結果より、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化してインスリンプロモーター活性を上昇させることにより、インスリン合成が増加し、結果としてインスリン含量が増えると考えられた。従って、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの「アゴニスト」は、糖尿病の予防及び／又は治療薬、特には、インスリン含量（生合成）増加薬となると考えられた。ここでいう「アゴニスト」とは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのシグナルを増強させ、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの作用を増強させる、すなわち、このポリペプチドを活性化させる、物質の総称である。

実施例4：細胞内cAMP濃度の変化を指標とした、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング

本実施例では、宿主細胞として、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞にエプス

タイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) を使用した。

コラーゲンコートした96穴プレートに293-EBNA細胞 (1×10^4 細胞/ウェル) を播種し、10%牛胎児血清 (FCS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で一晩培養した後、トランスフェクション試薬 (LIPOFECTAMINE 2000; GIBCO BRL社) を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS-NA又はプラスミドpEF-BOS (コントロール用の空ベクター) 0.01ngとpCRE-Lucベクター (CLONTECH社) 5ngとを遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に18~20時間培養し、培地で希釈した試験物質を加え、5%CO₂存在下、37℃で5~6時間インキュベートした。培地を吸引し、細胞溶解液 (細胞溶解液LCβ; 東洋インキ) で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット (ピッカジーン発光キット; 東洋インキ) 及び測定装置 (ML3000 microtiter plate luminometer; Dynatech Laboratories社) を用いて測定した。

プラスミドpEF-BOSを導入した細胞における試験物質処理によるレポーター活性値の上昇に対し、試験物質処理により、プラスミドpEF-BOS-NAを導入した細胞で1.5倍 (好ましくは5倍) 以上のレポーター活性値の上昇を確認することができれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させる作用を有する化合物として選択することができる。また、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させた細胞を用いて、試験物質処理後の細胞内cAMP量を既存の方法により直接測定することによっても試験物質の活性を測定することができる。

本実施例に記載の方法は、実施例5により選択される化合物が、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する化合物であるか否かの確認にも利用することができる。

実施例5：インスリンプロモーターレポーター活性を指標としたスクリーニング法

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する物質は、前記ポリペプチドを発現していない細胞に、配列番号2で表されるアミノ酸配列

からなるポリペプチド及びプラスミド *InsPro* を導入し、スクリーニングすることも可能である。また、本実施例で示すように、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対応するマウス由来ポリペプチドが発現していることが知られている（国際公開 W002/44362 号パンフレットの実施例 2 及び 3 参照） 膵 β 細胞株にプラスミド *InsPro* を導入し、化合物を評価することも可能である。

本実施例に示すスクリーニング法は、実施例 4 で選択される化合物のインスリンプロモーター活性増強作用の確認としても使用することができる。

マウス膵 β 細胞株 *NIT1* (4×10^4 細胞) に、トランスフェクション試薬 (LIPOFECTAMINE 2000; GIBCO BRL 社又は FuGENE6; Boehringer Mannheim 社) を用いて、実施例 2 で作製したプラスミド *InsPro* (1~10 ng) を導入し、96 穴プレートに播種した。培地としては、10% 牛胎児血清 (FCS) を含む、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 又は F-12 培地を用いた。播種後、18~20 時間培養し、培地で希釈した試験物質を加え、5% CO_2 存在下、37°C で 24 時間インキュベートした。培地を吸引し、細胞溶解液 (細胞溶解液 LC β ; 東洋インキ) で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット (ピッカジーン発光キット; 東洋インキ) 及び測定装置 (ML3000 microtiter plate luminometer; Dynatech Laboratories 社) を用いて測定した。試験物質処理により、コントロール (溶媒のみ) に対し有意なレポーター活性の上昇を確認することができた場合、インスリンプロモーター活性化作用を有する化合物と判断することができる。更に、コントロール細胞として、スクリーニングツール用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現していない細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験物質によりこれらのコントロール細胞では、インスリンプロモーターレポーター活性が上昇しない場合、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する化合物として判断することができる。

以上、実施例 4 又は実施例 5 単独で、あるいはこれらを組み合わせて行なうことにより、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させ、インスリンプロモーター活性を上昇させる化合物を選択することができる。

実施例 6 : 細胞内 cAMP 濃度の変化及びインスリンプロモーターレポーター活性を指標とした、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング

実施例 4 に記載の方法で化合物スクリーニングを行った結果、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート（LT-1 Z 0059519 ; LaboTest社、以下、化合物 A と称する）を取得することができた。また、細胞播種 3 時間後に遺伝子導入する点以外は実施例 4 に準じて化合物スクリーニングを行った結果、4-〔5-〔（E）-（1,3-ジエチル-5-オキソ-2-チオキソイミダゾリジン-4-イルリデン）メチル〕-2-フリル〕安息香酸（AN-465/14458032 ; SPECS社、以下、化合物 B と称する）、（2Z）-2,3-ビス（3,4-ジメトキシフェニル）アクリロニトリル（J. Org. Chem., 48, 4222-4232, 1983、以下、化合物 C と称する）、4-〔（E）-2-（3,4-ジメトキシフェニル）ビニル〕ピリジン（BAS 1550277 ; ASINEX社、以下、化合物 D と称する）、及び 5-〔〔4-（3-メチル-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル）ベンジル〕チオ〕-1H-1,2,4-トリアゾール-3-アミン（H-066028 ; SCIEXCH社、以下、化合物 E と称する）を取得することができた。各化合物 A ~ E は、それぞれ、 $10 \mu\text{mol/L}$ で、プラスミド pEF-BOS を導入した細胞におけるレポーター活性値の上昇に対し、プラスミド pEF-BOS-NA を導入した細胞で、化合物 A、化合物 D、及び化合物 E は 3 倍以上、化合物 B 及び化合物 C は 5 倍以上のレポーター活性値の上昇を確認することができ、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させる作用を有する化合物として選択した。

次に、実施例 5 に準じて化合物 A から化合物 E を評価した。但し、96 穴プレートは、コラーゲンコートされた 96 穴プレートを使用し、培地は、DMEM を用いた。また、化合物処理を化合物 A は 31 時間、化合物 B から化合物 E は 24 時間行った。結果（平均値 \pm 標準誤差、 $n=6$ ）を図 2 及び図 3 に示す。化合物 A（ $30 \mu\text{mol/L}$ ）又は化合物 B から化合物 E（いずれも $10 \mu\text{mol/L}$ ）処理群のレポーター活性値は、いずれもコントロール（すなわち、化合物濃度 $0 \mu\text{mol/L}$ 群）のレポーター活性値よりも 1.5 倍以上と有意に大きかった。図 2 及び図 3 に示す記号「**」は、コントロール群 [すなわち、化合物 A

から化合物E無添加群]に対する有意差が、 $p < 0.01$ （スチューデントの t 検定）であることを意味する。

以上、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させる化合物Aから化合物Eは、インスリンプロモーター活性を上昇させること、すなわち、インスリン産生促進活性を有し、インスリン含量を増加させることがわかった。

参考例：SDラット及びGKラットを用いた単回経口糖負荷試験

SDラット（4週齢；日本クレア社）は、一晚絶食させ、グルコース 2 g/kg を経口投与した。なお、グルコース負荷5分前に、化合物A 100 mg/kg を腹腔内投与（i. p.）した。グルコース負荷後、0分間、30分間、60分間、及び120分間経過後に適量採血し、血糖値及び血漿中インスリン濃度の測定に供した。

血糖値の測定には、血液と 0.33 mol/L 過塩素酸とを混合（血液： 0.33 mol/L 過塩素酸 = $1:10$ ）した後、遠心分離（ $3000 \times g$, 10分間, 4°C ）した上澄液を用いた。血漿中インスリン濃度の測定には、血液を遠心分離（ $3000 \times g$, 10分間, 4°C ）した上澄液を用いた。また、血糖値の測定には、グルコースCテストワコー（Wako社）を用いた。また、血漿中インスリン濃度の測定には、ラットーインスリンアッセイシステム（Amersham社）を用いた。

結果を図4及び図5に示す。図4は、グルコース経口負荷後の血漿中インスリン濃度（単位= ng/mL ）の経時変化を示し、図5は、グルコース経口負荷後の血糖値（単位= mg/dL ）の経時変化を示す。図4及び図5に示す記号「*」は、化合物A無添加群に対する有意差が、 $p < 0.05$ （スチューデントの t 検定）であることを意味する。

図4に示すように、化合物A 100 mg/kg 投与により、グルコース負荷後30分間経過後において、血漿中インスリン濃度の有意な上昇が認められた。また、グルコース負荷後30分間経過後において、化合物A 100 mg/kg 投与群で、糖負荷による血糖値の上昇が有意に抑制された。

従って、糖負荷SDラットにおいて、化合物Aの血漿中インスリン量増加作用、

及び血糖低下作用が確認された。

次に、GK (Goto-Kakizaki) ラット (インスリン分泌不全2型糖尿病モデル、7週齢; 日本チャールスリバー社) を用いた単回経口糖負荷試験を行なった。なお、GKラットは、1975年東北大学医学部後藤由夫名誉教授らによって、Wistar系ラットにおける経口糖負荷試験時の耐糖能の悪さを指標に、選択交配により確立された系統である。

経口糖負荷試験は、化合物Aを経口投与 (p. o.) したこと以外は、SDラットの場合と同様に行なった。

グルコース経口負荷後の血糖値 (単位=mg/dL) の経時変化を、図6に示す。図6に示す記号「*」は、化合物A無添加群に対する有意差が、 $p < 0.05$ (スチューデントのt検定) であることを意味し、記号「**」は、前記有意差が $p < 0.01$ であることを意味する。

図6に示すように、グルコース負荷後30分間及び60分間経過後において、化合物A 100mg/kg投与により、血糖値の上昇が有意に抑制され、化合物Aの有効性が糖尿病モデルラットでも確認できた。

産業上の利用可能性

本発明のスクリーニングツール又はスクリーニング方法によれば、インスリン産生を促進することのできるインスリン含量増加剤をスクリーニングすることができる。前記インスリン含量増加剤は、糖尿病予防及び/又は治療に有効な物質である。

配列表フリーテキスト

配列表の配列番号5及び6の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～15個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。
3. 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。
4. 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドからなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。
5. 請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチドを発現している細胞からなる、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。
6. 請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項5に記載の細胞の、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングのための使用。
7. 請求項5に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法。

8. 請求項5に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験物質とを接触させる工程、及び請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、並びに、製剤化工程を含む、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の製造方法。
9. 請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチドを活性化する物質を有効成分として含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤。
10. 請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチドを活性化する物質を投与することからなる、インスリン産生促進及び／又はインスリン含量増加方法。
11. インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物製造のための、請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチドを活性化する物質の使用。

1/3

FIG. 1

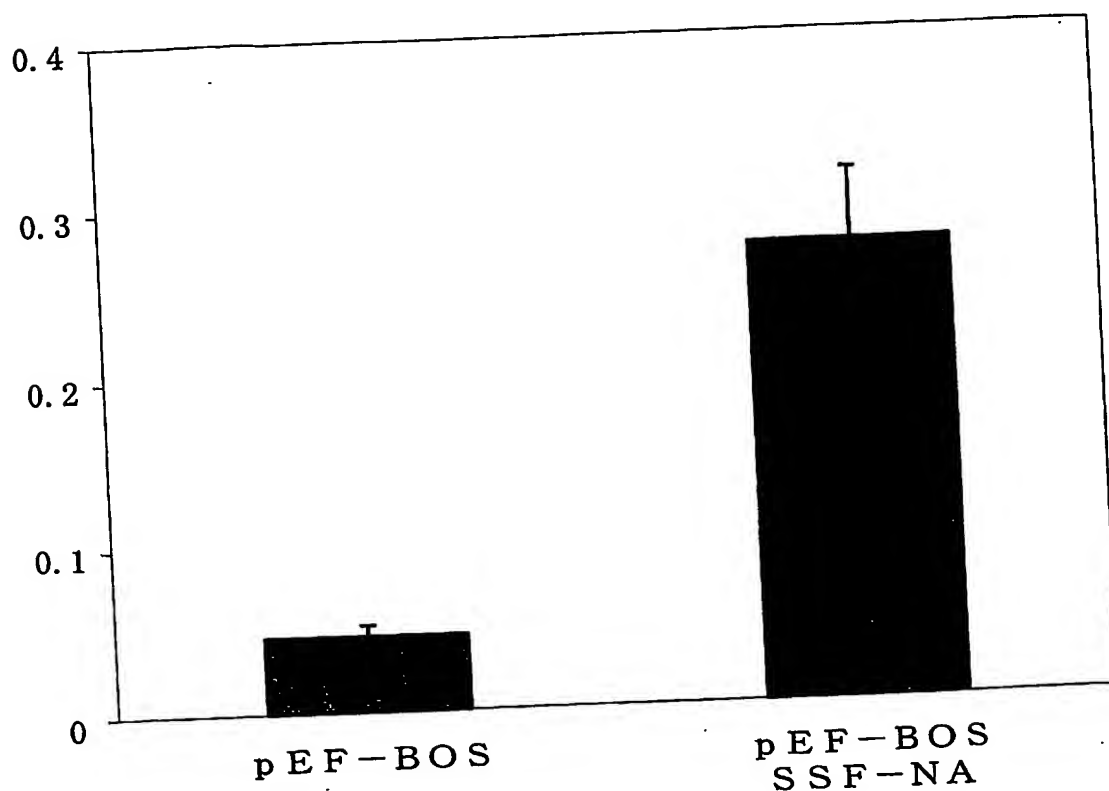
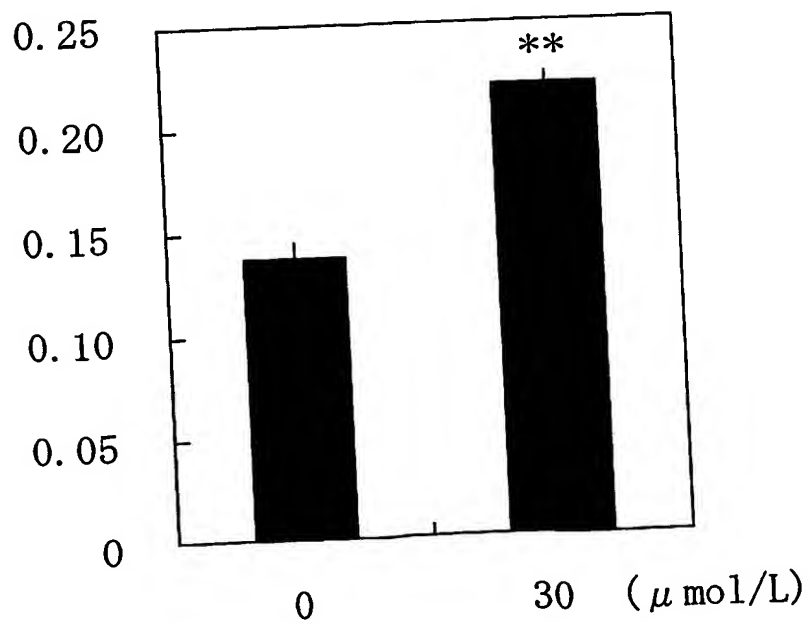


FIG. 2



2/3

FIG. 3

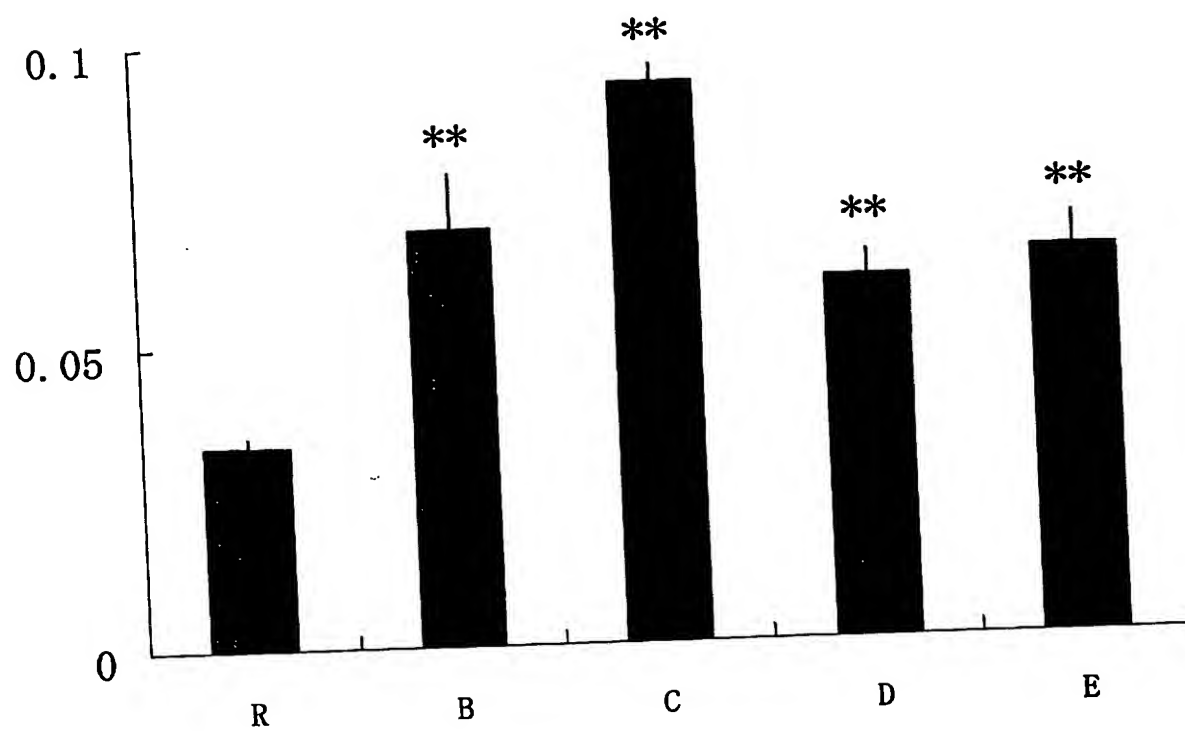
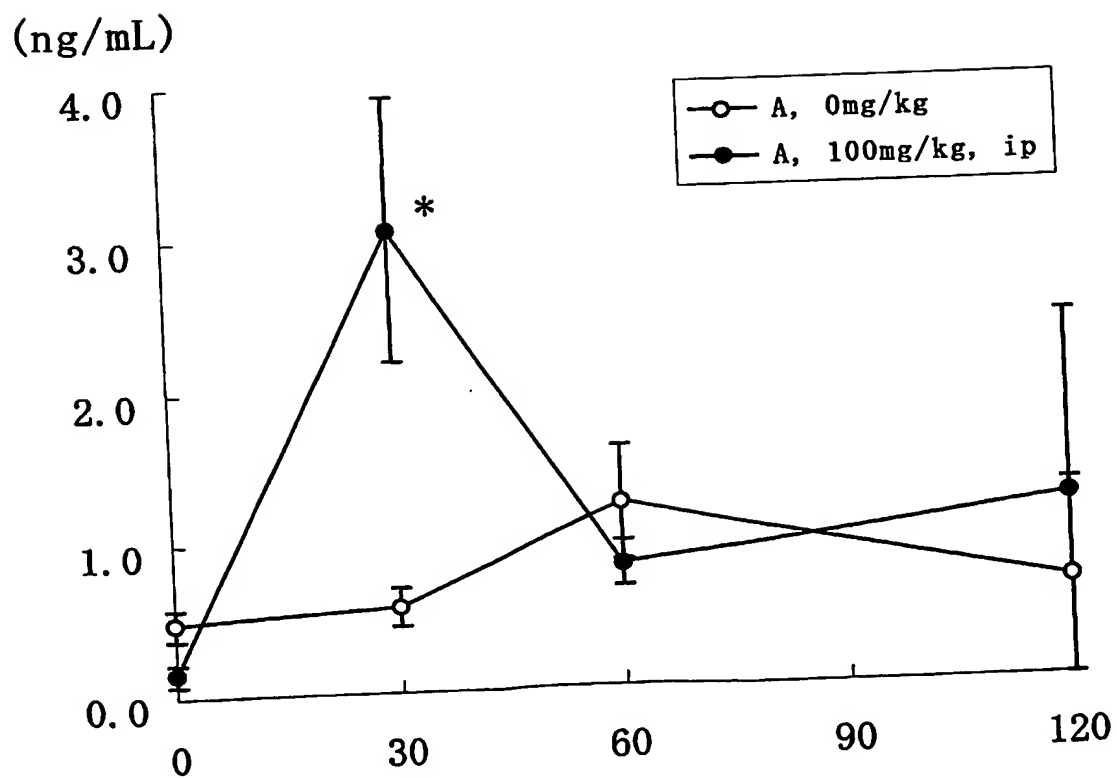


FIG. 4



3/3

FIG. 5

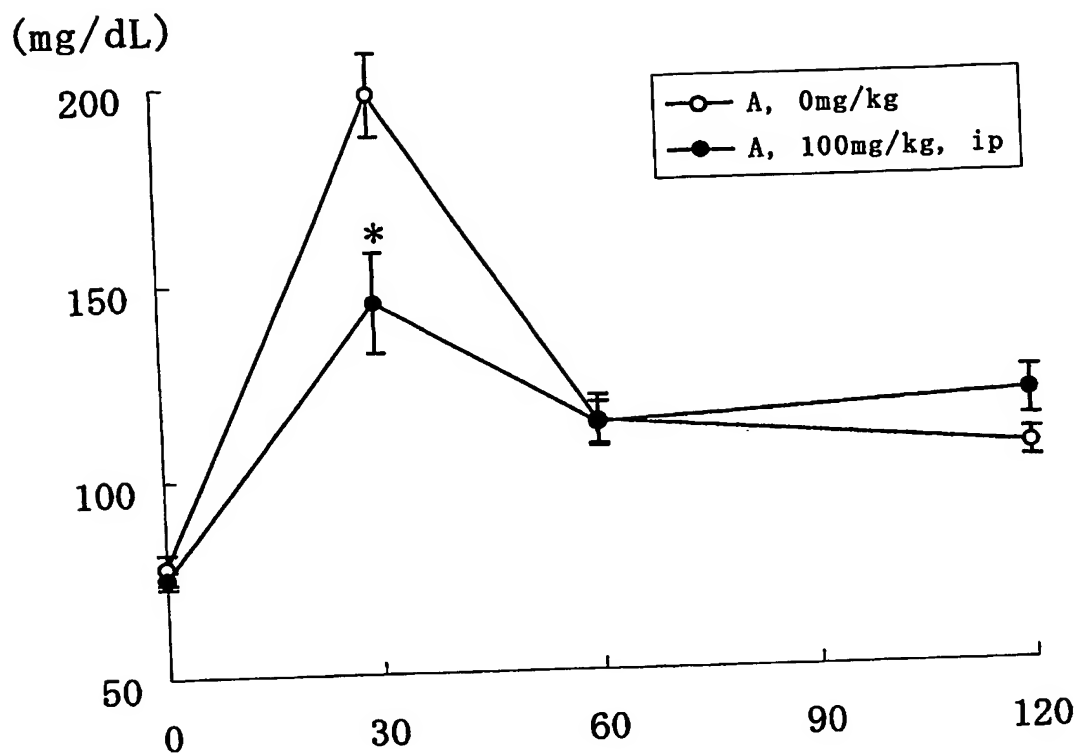
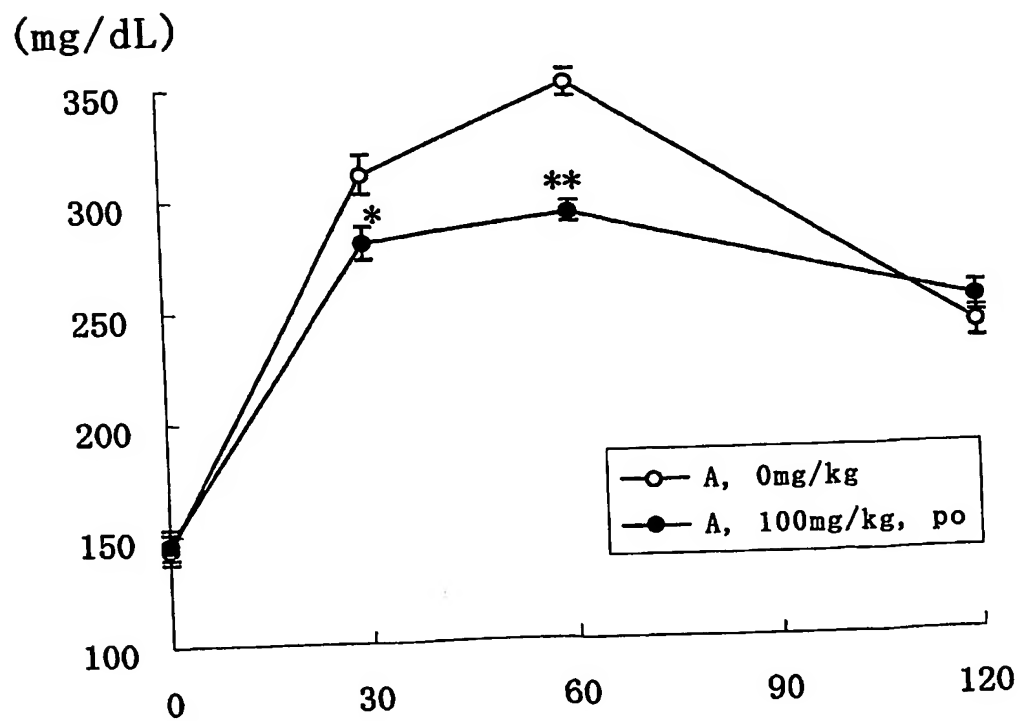


FIG. 6



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Screening method of agents for increasing insulin content

<130> Y0352PCT-698

<150> JP 2002-265622

<151> 2002-09-11

<150> JP 2003-056813

<151> 2003-03-04

<160> 7

<210> 1

<211> 1008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Ohishi, Takahide; Koizumi, Tomonobu

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1008)

<400> 1

atg gaa tca tct ttc tca ttt gga gtg atc ctt gct gtc ctg gcc tcc 48
Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Ala Ser
1 5 10 15

ctc atc att gct act aac aca cta gtg gct gtg gct gtg ctg ctg ttg 96
Leu Ile Ile Ala Thr Asn Thr Leu Val Ala Val Ala Val Leu Leu Leu
20 25 30

atc cac aag aat gat ggt gtc agt ctc tgc ttc acc ttg aat ctg gct 144
Ile His Lys Asn Asp Gly Val Ser Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala
35 40 45

gtg gct gac acc ttg att ggt gtg gcc atc tct ggc cta ctc aca gac 192
Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Leu Thr Asp
50 55 60

cag ctc tcc agc cct tct cgg ccc aca cag aag acc ctg tgc agc ctg 240

Gln Leu Ser Ser Pro Ser Arg Pro Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu
 65 70 75 80

cgg atg gca ttt gtc act tcc tcc gca gct gcc tct gtc ctc acg gtc 288
 Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95

atg ctg atc acc ttt gac agg tac ctt gcc atc aag cag ccc ttc cgc 336
 Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg
 100 105 110

tac ttg aag atc atg agt ggg ttc gtg gcc ggg gcc tgc att gcc ggg 384
 Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly
 115 120 125

ctg tgg tta gtg tct tac ctc att ggc ttc ctc cca ctc gga atc ccc 432
 Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro
 130 135 140

atg ttc cag cag act gcc tac aaa ggg cag tgc agc ttc ttt gct gta 480
 Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val
 145 150 155 160

ttt cac cct cac ttc gtg ctg acc ctc tcc tgc gtt ggc ttc ttc cca 528
 Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro
 165 170 175

gcc atg ctc ctc ttt gtc ttc ttc tac tgc gac atg ctc aag att gcc 576
 Ala Met Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala
 180 185 190

tcc atg cac agc cag cag att cga aag atg gaa cat gca gga gcc atg 624
 Ser Met His Ser Gln Gln Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met
 195 200 205

gct gga ggt tat cga tcc cca cgg act ccc agc gac ttc aaa gct ctc 672
 Ala Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Asp Phe Lys Ala Leu
 210 215 220

cgt act gtg tct gtt ctc att ggg agc ttt gct cta tcc tgg acc ccc 720
 Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Trp Thr Pro
 225 230 235 240

ttc ctt atc act ggc att gtg cag gtg gcc tgc cag gag tgt cac ctc 768
 Phe Leu Ile Thr Gly Ile Val Gln Val Ala Cys Gln Glu Cys His Leu
 245 250 255

tac cta gtg ctg gaa cgg tac ctg tgg ctg ctc ggc gtg ggc aac tcc 816
 Tyr Leu Val Leu Glu Arg Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser
 260 265 270

ctg ctc aac oca ctc atc tat gcc tat tgg cag aag gag gtg cga ctg 864
 Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Lys Glu Val Arg Leu
 275 280 285

cag ctc tac cac atg gcc cta gga gtg aag aag gtg ctc acc tca ttc 912
 Gln Leu Tyr His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Val Leu Thr Ser Phe
 290 295 300

ctc ctc ttt ctc tcg gcc agg aat tgt ggc cca gag agg ccc agg gaa 960
 Leu Leu Phe Leu Ser Ala Arg Asn Cys Gly Pro Glu Arg Pro Arg Glu
 305 310 315 320

agt tcc tgt cac atc gtc act atc tcc agc tca gag ttt gat ggc taa 1008
 Ser Ser Cys His Ile Val Thr Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asp Gly
 325 330 335

<210> 2
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ala Thr Asn Thr Leu Val Ala Val Ala Val Leu Leu Leu
 20 25 30
 Ile His Lys Asn Asp Gly Val Ser Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala
 35 40 45
 Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Leu Thr Asp
 50 55 60
 Gln Leu Ser Ser Pro Ser Arg Pro Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95
 Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg
 100 105 110
 Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly
 115 120 125
 Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro
 130 135 140

Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val
 145 150 155 160
 Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro
 165 170 175
 Ala Met Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala
 180 185 190
 Ser Met His Ser Gln Gln Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met
 195 200 205
 Ala Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Asp Phe Lys Ala Leu
 210 215 220
 Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Trp Thr Pro
 225 230 235 240
 Phe Leu Ile Thr Gly Ile Val Gln Val Ala Cys Gln Glu Cys His Leu
 245 250 255
 Tyr Leu Val Leu Glu Arg Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser
 260 265 270
 Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Lys Glu Val Arg Leu
 275 280 285
 Gln Leu Tyr His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Val Leu Thr Ser Phe
 290 295 300
 Leu Leu Phe Leu Ser Ala Arg Asn Cys Gly Pro Glu Arg Pro Arg Glu
 305 310 315 320
 Ser Ser Cys His Ile Val Thr Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asp Gly
 325 330 335

<210> 3
 <211> 1008
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1008)

<400> 3
 atg gag tca tct ttc tca ttt gga gtg atc ctt gct gtc ctg acc atc 48
 Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Thr Ile
 1 5 10 15
 ctt atc att gct gtt aat gog ctg gtg gtt gtg gct atg ctg cta tca 96
 Leu Ile Ile Ala Val Asn Ala Leu Val Val Val Ala Met Leu Leu Ser
 20 25 30
 atc tac aag aat gat ggt gtt ggc ctt tgc ttc acc tta aat ctg gcc 144
 Ile Tyr Lys Asn Asp Gly Val Gly Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala

35	40	45	
gtg gct gat acc ttg att ggc gtg gct att tct ggg cta gtt aca gac			192
Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Val Thr Asp			
50	55	60	
cag ctc tcc agc tct gct cag cac aca cag aag acc ttg tgt agc ctt			240
Gln Leu Ser Ser Ser Ala Gln His Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu			
65	70	75	80
cgg atg gca ttc gtc act tct tct gca gcc gcc tct gtc ctc acg gtc			288
Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ser Val Leu Thr Val			
85	90	95	
atg ctg att gcc ttt gac agg tac ctg gcc att aag cag ccc ctc cgt			336
Met Leu Ile Ala Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Leu Arg			
100	105	110	
tac ttc cag atc atg aat ggg ctt gta gcc gga gga tgc att gca ggg			384
Tyr Phe Gln Ile Met Asn Gly Leu Val Ala Gly Gly Cys Ile Ala Gly			
115	120	125	
ctg tgg ttg ata tct tac ctt atc ggc ttc ctc cca ctt gga gtc tcc			432
Leu Trp Leu Ile Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Val Ser			
130	135	140	
ata ttc cag cag acc acc tac cat ggg ccc tgc acc ttc ttt gct gtg			480
Ile Phe Gln Gln Thr Thr Tyr His Gly Pro Cys Thr Phe Phe Ala Val			
145	150	155	160
ttt cac cca agg ttt gtg ctg acc ctc tcc tgt gct ggc ttc ttc cca			528
Phe His Pro Arg Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Ala Gly Phe Phe Pro			
165	170	175	
gct gtg ctc ctc ttt gtc ttc ttc tac tgt gac atg ctc aag att gcc			576
Ala Val Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala			
180	185	190	
tct gtg cac agc cag cac atc cgg aag atg gaa cat gca gga gcc atg			624
Ser Val His Ser Gln His Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met			
195	200	205	
gtt gga gct tgc cgg ccc cca cgg cct gtc aat gac ttc aag gct gtc			672
Val Gly Ala Cys Arg Pro Pro Arg Pro Val Asn Asp Phe Lys Ala Val			
210	215	220	

cgg act gta tct gtc ctt att ggg agc ttc acc ctg tcc tgg tct ccg 720
 Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Thr Leu Ser Trp Ser Pro
 225 230 235 240
 ttt ctc atc act agc att gtg cag gtg gcc tgc cac aaa tgc tgc ctc 768
 Phe Leu Ile Thr Ser Ile Val Gln Val Ala Cys His Lys Cys Cys Leu
 245 250 255
 tac caa gtg ctg gaa aaa tac ctc tgg ctc ctt gga gtt ggc aac tcc 816
 Tyr Gln Val Leu Glu Lys Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser
 260 265 270
 ctg ctc aac cca ctc atc tat gcc tat tgg cag agg gag gtt cgg cag 864
 Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Arg Glu Val Arg Gln
 275 280 285
 cag ctc tgc cac atg gcc ctg ggg gtg aag aag ttc ttt act tca atc 912
 Gln Leu Cys His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Phe Phe Thr Ser Ile
 290 295 300
 ttc ctc ctt ctc tcg gcc agg aat cgt ggt cca cag agg acc cga gaa 960
 Phe Leu Leu Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gly Pro Gln Arg Thr Arg Glu
 305 310 315 320
 agc tcc tat cac atc gtc act atc agc cag ccg gag ctc gat ggc tag 1008
 Ser Ser Tyr His Ile Val Thr Ile Ser Gln Pro Glu Leu Asp Gly
 325 330 335

<210> 4
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 4
 Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Thr Ile
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ala Val Asn Ala Leu Val Val Val Ala Met Leu Leu Ser
 20 25 30
 Ile Tyr Lys Asn Asp Gly Val Gly Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala
 35 40 45
 Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Val Thr Asp
 50 55 60
 Gln Leu Ser Ser Ser Ala Gln His Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val

Met Leu Ile Ala Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Leu Arg
85 90 95
100 105 110
Tyr Phe Gln Ile Met Asn Gly Leu Val Ala Gly Gly Cys Ile Ala Gly
115 120 125
Leu Trp Leu Ile Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Val Ser
130 135 140
Ile Phe Gln Gln Thr Thr Tyr His Gly Pro Cys Thr Phe Phe Ala Val
145 150 155 160
Phe His Pro Arg Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Ala Gly Phe Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala
180 185 190
Ser Val His Ser Gln His Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met
195 200 205
Val Gly Ala Cys Arg Pro Pro Arg Pro Val Asn Asp Phe Lys Ala Val
210 215 220
Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Thr Leu Ser Trp Ser Pro
225 230 235 240
Phe Leu Ile Thr Ser Ile Val Gln Val Ala Cys His Lys Cys Cys Leu
245 250 255
Tyr Gln Val Leu Glu Lys Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser
260 265 270
Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Arg Glu Val Arg Gln
275 280 285
Gln Leu Cys His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Phe Phe Thr Ser Ile
290 295 300
Phe Leu Leu Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gly Pro Gln Arg Thr Arg Glu
305 310 315 320
Ser Ser Tyr His Ile Val Thr Ile Ser Gln Pro Glu Leu Asp Gly
325 330 335

$\langle 210 \rangle$	5
$\langle 211 \rangle$	28
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 5
aaaagcttcc tgcagcctcc agctctcc

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 6 24
aaccatggcc tcttctgatg cagc

<210> 7
<211> 377
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cctgcagcct ccagctctcc tggctaatg tggaaagtgg cccaggtgag ggctttgctc 60
tcctggagac atttgcccc agctgtgagc agggacaggt ctggccaccg ggcccctggt 120
taagactcta atgaccgct ggtcctgagg aagaggtgct gacgaccaag gagatcttcc 180
cacagaccca gcaccaggga aatggtcgg aaattgcagc ctcagcccc agccatctgc 240
cgaccccccc accccaggcc ctaatggggc aggcggcagg ggttgacagg taggggagat 300
gggctctgag actataaagc cagcgggggc ccagcagccc tcagccctcc aggacaggct 360
gcatcagaag aggccat 377

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/02, 1/66, C07K14/72, G01N33/15, 33/50, A61K45/00,
A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/02, 1/66, C07K14/72, G01N33/15, 33/50, A61K45/00,
A61P3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/BIOSIS (DIALOG), EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 02/44362 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 06 June, 2002 (06.06.02), & EP 1338651 A1 & JP 3438186 B2	1-7/6-7
Y	Kemp D.M. et al., Synergistic effect of dimethyl sulfoxide on glucagon-like peptide 1 (GLP-1)-stimulated insulin secretion and gene transcription in INS-1 cells: characterization and implications. Biochemical Pharmacology, August 2002, Vol.64, No.4, pages 689 to 697.	6-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 October 2003 (07.10.03)

Date of mailing of the international search report
21 October, 2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11548

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 10 pertains to "methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods" as specified in Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT.

2. ☒ Claims Nos.: 8-11

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The description discloses only several specific examples of "a substance activating the polypeptide" as set forth in claims 9 to 11. Thus, claims 9 to 11 are neither fully supported by the description nor disclosed therein. Although the common technical knowledge at the point (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11548

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

of the application is taken into consideration, it is completely unknown what substances correspond thereto other than the disclosed ones. Therefore, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims. The same applies to the invention as set forth in claim 8, since it involves the step of producing a preparation of "a substance activating the polypeptide".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/02, 1/66, C07K14/72, G01N33/15, 33/50,
A61K45/00, A61P3/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/02, 1/66, C07K14/72, G01N33/15, 33/50,
A61K45/00, A61P3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG),
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 02/44362 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2002.06.06 & EP 1338651 A1 & JP 3438186 B2	1-7/6-7
Y	Kemp D.M., et al. Synergistic effect of dimethyl sulfoxide on glucagon- like peptide 1 (GLP-1)-stimulated insulin secretion and gene transcription in INS-1 cells: characterization and implications. Biochemical Pharmacology August 2002, Vol.64, No.4, p.689-697	6-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.10.03

国際調査報告の発送日

21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
北村 弘樹



4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲10に記載されている発明は、PCT規則39.1(iv)の「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に該当する。
2. ☒ 請求の範囲 8-11 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
明細書には、請求の範囲9-11に記載の「ポリペプチドを活性化する物質」として具体的なものが数例しか記載されていない。よって、請求の範囲9-11は明細書による十分な裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても開示された物質の他にいかなる物質が該当するのか全く不明である。よって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査ができない。請求の範囲8に記載の発明も「ポリペプチドを活性化する物質」を製剤化する工程を含むため、同様である。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.